

鼻粘膜における Na^+/H^+ Exchanger の発現と局在に関する研究

福島 久毅

Na^+/H^+ Exchanger (NHE) は細胞内外の Na^+ イオンの濃度勾配を駆動力として用いて Na^+ イオンと H^+ イオンを 1 : 1 で交換輸送することで細胞内 pH 調節や Na^+ イオン、水分輸送を行う重要な膜蛋白である。現在まで NHE1~7 のアイソフォームが同定されている。気道においては生理学的手法で気道上皮細胞および気道粘膜表面の粘液層 airway surface liquid (ASL) の pH 調節に NHE が関与していると報告されている。しかし、気道、特に鼻粘膜における NHE のアイソフォームの同定および局在は知られていない。そこで今回ヒトおよびモルモットの鼻粘膜を用いて NHE1~4 のアイソフォームの同定および発現の局在について検討した。まずアイソフォームの同定のためモルモット鼻粘膜の RT-PCR を施行し、NHE 1, 3 の mRNA を検出したが NHE2, 4 は検出されなかった。つぎに局在を調べるためヒトおよびモルモットの鼻粘膜の *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。ハウスキーピングである NHE 1 は鼻粘膜上皮細胞にのみ認められた。NHE 3 は NHE1 に比べて発現量は少ないが、鼻粘膜上皮細胞に発現していた。NHE 3 は鼻粘膜上皮細胞だけでなく粘膜固有層にも発現を認めたが、腺細胞にはなかった。以上の結果からハウスキーピングである NHE 1 は、鼻粘膜上皮細胞に特に多く発現していることが明らかとなった。上皮細胞および ASL におけるイオン輸送、pH、浸透圧調節に、上皮細胞の基底膜側の NHE 1 と、管腔側の NHE 3 の両方が関与していると考えられた。

(平成14年2月26日受理)

Expression and Localization of Na^+/H^+ Exchanger (NHE) Isoforms in Nasal Mucosa

Hisaki FUKUSHIMA

The Na^+/H^+ exchanger (NHE) is an important regulator for intracellular pH, cell volume, and transepithelial Na^+ transport. The NHE has a tightly coupled 1 : 1 stoichiometry for exchange of Na^+ and H^+ . The exchange reaction is driven by the transmembrane chemical gradients for Na^+ . The presence of multiple forms of the exchanger has been demonstrated by the recent cloning of seven NHEs, NHE1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7. Physiological studies have shown the NHE to be a carrier protein regulating airway surface liquid (ASL) pH and the intracellular pH in airway epithelial cells. To date, the localization of the NHE isoforms in airway is not known. The present study was undertaken to examine the expression and distribution of NHE1-4 isoforms in guinea pig and human nasal mucosa. We used the reverse transcription-polymerase chain reaction to assess the expression of NHE1-4 isoforms. Although NHE 2 and 4 isoform mRNAs could not be detected in guinea pig nasal mucosa tissue, NHE1 and 3 mRNAs were predominant. We used *in situ*

hybridization to examine their localization in guinea pig and human nasal mucosa. NHE 1 isoform mRNA was distributed in nasal epithelial cells, as was NHE 3 isoform mRNA, but the latter's expression was lower than that of NHE 1. NHE 3 isoform mRNA also distributed in the lamina propria. Although NHE 1 was housekeeping, it became clear that it is especially mostly expressed into a nasal epithelial cells. These findings suggest that NHE 1 and 3 regulate ASL pH and the intracellular pH in airway epithelial cells. (Accepted on February 26, 2002) *kawasaki Igakkaishi* 28(2): 83-93, 2002

Key Words ① Na^+/H^+ exchanger ② Nasal mucosa
③ Airway surface liquid
④ Reverse transcription-polymerase chain reaction
⑤ In situ hybridization

はじめに

Na^+/H^+ Exchanger (NHE) は体内に広く分布する膜蛋白である。 Na^+/K^+ ATPase (Na^+ ポンプ) によって作り出された細胞内、細胞外のナトリウムの濃度勾配を駆動力として用いて細胞外 Na^+ イオンと細胞内 H^+ イオンを 1 : 1 で交換輸送する電氣的に中性のイオン輸送体である^{1)~5)}。NHE は細胞内 pH を感知するドメインをもち⁶⁾、細胞内 pH が低下すると H^+ イオンを汲み出して細胞内 pH を一定に保つ。また、 Na^+ イオンと共に水を流入させ細胞容積を回復させるように働く。このように NHE は細胞内の pH のホメオスタシスの維持、 Na^+ イオン、水分調節に重要な役割を果たしていることが知られている⁷⁾。1989年にヒトの NHE の cDNA がクローニングされて以来⁸⁾、現在まで NHE1~7 のアイソフォームが同定されている^{8)~14)}。NHE1, 2, 3, 4, 5 は細胞質膜に存在し^{8)~12)}、NHE 6, 7 は細胞内器官に存在する^{13)~14)}。NHE1 はハウスキーピングですべての細胞に普遍的に存在するが特に腎尿細管、消化管上皮、心筋¹⁵⁾ に存在し、主に pH 調節に関与し、極性のある上皮では基底膜側に局在している^{16), 17)}。NHE2, 3, 4 は限られた部位に発現し腎尿細管、消化管上皮などで確認されている^{9), 10), 12), 18), 19)}。NHE3 は上皮の管腔側に局在し主に Na^+ イオン吸収を行っている^{16), 20)}。NHE5 は脳、精巣、卵巣、脾臓、

骨格筋で発現している²¹⁾。NHE6 はミトコンドリアの内膜に¹³⁾、NHE7 はゴルジ体にある¹⁴⁾。アミロライドに対する感受性は NHE1, 2 であり、3, 4 ではない^{22), 23)}。NHE の局在、機能は解明されてきたが、気道における研究はほとんどなされていない。

airway surface liquid (ASL) は気道上皮の表面で空気にさらされている薄い液体の層である。ASL の量、イオン構成、pH は、正常の気道生理に重要であるだけでなく、嚢胞性線維症、喘息にも重要であり^{24)~27)}、ASL の異常は気管支収縮、咳反射、気道感染を起こす^{28)~32)}。ASL の形成や性状は、杯細胞や腺、上皮-粘液間の水分、電解質の移動などによって規定されており、この電解質の移動には K^+ チャンネル、 Cl^- チャンネル、 Na^+/K^+ ATPase、 $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ 共輸送体などの膜輸送蛋白が作用している³³⁾。NHE の pH および Na^+ イオン、水分調節機能も、鼻粘膜および ASL に関与していると考えられる。

気道における NHE の報告は、生理学的手法で II 型肺胞上皮細胞³⁴⁾、鼻茸上皮細胞の培養細胞の基底膜側にアミロライド感受性の NHE の存在が^{35), 36)}、また気管、気管支上皮に RT-PCR でハウスキーピングである NHE1 の存在が報告されている³⁷⁾。しかし、NHE1~4 のアイソフォームの局在の記載はない。そこで今回ヒトおよびモルモットの鼻粘膜を用いて NHE のタイプの同定および局在について検討した。なお、本実験は川崎医科大学動物実験委員会の承

認を受け (No. 00-095), 本大学の動物実験指針に基づき行った。

材 料 と 方 法

1. RNA の単離

6 週齢雄, モルモットをジエチルエーテルで吸入麻酔後, 断頭して鼻粘膜および小腸を摘出し液体窒素で凍結した。また同意の上で肥厚性鼻炎患者に下鼻甲介切除術を施行し, 摘出したヒト下鼻甲介粘膜を同様に液体窒素で凍結した。モルモット鼻粘膜, 小腸およびヒト鼻粘膜から total-RNA を抽出するため, ISOGEN (ニッポンジーン) を添加しホモジナイズした。クロロホルムを添加, 遠心分離し, 分離された水層にイソプロパノールを添加し, RNA を沈澱させた。70%エタノールで洗浄後, total-RNA を DEPC 処理水に溶解し, RNase インヒビター, DNase を添加 37°C 2 時間反応させ, RNA の再抽出を行った。total-RNA 量は波長 260 nm の吸光度測定値より算定した。

2. complementary DNA の作製

total-RNA から cDNA を作製した。モルモットおよびヒト total-RNA にオリゴ(dt) ランダムプライマーを加え, 72°C 2 分反応後, 氷上に移し, さらに RNase インヒビター, dNTP mixture, DTT, 逆転写酵素を加え, 37°C 1 時間反応させ cDNA を作製した。

3. モルモット鼻粘膜の RT-PCR³⁸⁾

一次 PCR はモルモット鼻粘膜の cDNA およびコントロールとして小腸の cDNA を試料として external-sense プライマー S 12 E, S 3 E, S 4 E (Table 1) と antisense プライマー AS1, AS2, AS3, AS4 (Table 1) を用いて行った。二次 PCR は 5 μ l の一次 PCR 反応産物を試料として internal-sense プライマー S1I, S2I, S3I, S4I (Table 1) と antisense プライマー AS1, AS2, AS3, AS4 (Table 1) を用いて行った。また, コントロールとして G3PDH プライマー S, AS (Table 1) を用いた。それぞれの PCR は DMSO, dNTP mixture と ampli Taq DNA ポリ

Table 1. PCR primers and expected PCR product sizes

Isoform		Primer sequences 5'-3'	PCR product size
NHE1 :	S12E	CTGCTCTCAACGATGC (AC) GTCAC	519
	S1I	GCCAGCTATGAGTATGTGGGCATC	468
	AS1	GATGAACCAGGTCAGGAACCAG	
NHE2 :	S12E	CTGCTCTCAACGATGC (AC) GTCAC	519
	S2I	CAGATGAAGACCATCCAGACCGTA	465
	AS2	AATCACCTGAGTCAGGACAAA	
NHE3 :	S3E	CCTTGGAACAGAGGCGGAGGAG	260
	S3I	GGAACAGAGGCGGAGGAGDAT	256
	AS3	TCCGCTTCTGTGCGCGCTCCCT	
NHE4 :	S4E	CTGCTATTTGGCAGCCTGAT	646
	S4I	AATTTGAGGACATAGAAGCG	464
	AS4	ACTGACATAGAAGAGGGTAAA	
G3PDH :	S	ACCACAGTCCATGCCATCAC	463
	AS	TCCACCACCCTGTTGCTGTTGCTGTA	

メラーゼ (TaKaRa Shuzo, Japan) を混合し programmable thermal cycler(model 2400 ; Perkin Elmer, Norwalk, CT) にて 94°C 5 分の melting, (94°C 30秒 ; 58°C 30秒 ; 72°C 1 分) を 1 クールとして 30 サイクル行った。さらに 72°C 7 分の反応を行った。PCR 産物は 2 % アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロミド染色し観察した。モルモット鼻粘膜の NHE1, 2, 3, 4 の二次 PCR 反応産物をそれぞれ pZerO_{TM}-2 ベクター (Invitrogen, SanDigo, CA, USA) にクローニングし DNA シークエンサーにて塩基配列を確認した。

4. モルモットおよびヒト鼻粘膜の *in situ* ハイブリダイゼーション

1) モルモット NHE の塩基配列の確認と DIG 標識 RNA プロブの作製 : モルモットおよびヒト鼻粘膜から作製した cDNA を試料としプライマー S-1, AS-1 (Table 2) を用いて一次 PCR を行い, この一次 PCR 反応産物を試料としプライマー S-2, AS-2 (Table 2) を用いて二次 PCR を行った。PCR は 93°C 1 分の melting, (93°C 1 分 ; 60°C 1 分から 1 サイクルにつき 1°C ずつ低下 ; 72°C 3 分) を 1 クールとして 10 サイクル, さらに (93°C 1 分 ; 50°C 1 分 ; 72°C 3 分) を 1 クールとして 25 サイクル, つぎに 72°C 10 分の反応を行った。PCR 産物

Table 2. PCR primers and expected PCR product sizes

	Primer sequence 5'-3'	PCR product size			
		NHE1	NHE2	NHE3	NHE4
S-1	CT (CG) CC (AC) CC (CT) AT (CT) (AG) T (CG) (CT) TGG A	698	698	704	707
AS-1	A (GT) GAA (CG) ATGAAGAT (AG) A (GT) GGTCTC				
S-2	GG (CG) TACTTC (AC) TGCC (CT) (AC)	646	646	653	661
AS-2	C (AG) CT (GT) (CG) (CT) C (AC) (AG) CATCTTCA				

は2%アガロースゲル電気泳動後エチジウムブロミド染色し確認後、pZerO_{TM}-2ベクターにクローニングしDNAシーケンサーにて塩基配列を調べた。これによりプラスミド gpNHE1, 2, 3, 4とプラスミド humNHE3を得た。gpNHE1, 2, 3, 4はラット NHE と比較した塩基配列およびアミノ酸配列の相同性を調べた。

アンチセンスプローブを作製のため gpNHE1を Xho1, gpNHE2を Not1, gpNHE3を Xba1, gpNHE4を Xho1 制限酵素で切断, humNHE3を Xba1制限酵素で切断し直線化した。DIG RNA Labeling kit (Behringer Mannheim, Germany) を用いて DIG-11-UTP と SP6 RNA ポリメラーゼを添加しモルモット NHE1, 2, 3, 4 およびヒト NHE3の DIG 標識 RNA アンチセンスプローブを作製した。同様に非特異的なネガティブコントロールとして gpNHE1, humNHE3をそれぞれ BamH1 で直線化し DIG-11-UTP と T7 RNA ポリメラーゼを添加しモルモットおよびヒトのセンスプローブを作った。

2) 鼻粘膜の切片作製: 6匹の6週齢雄, モルモットをジエチルエーテルにて吸入麻酔後, ヘパリン生食および4%パラホルムアルデヒド (PF)/0.1 M PB で灌流固定したのち, 鼻粘膜および小腸を摘出 4% PF/0.1 M PB で4℃で12時間固定した。また肥厚性鼻炎患者の下鼻甲介切除術で摘出した鼻粘膜を4% PF/0.1 M PB で4℃で24時間固定した。固定したモルモット鼻粘膜, 小腸およびヒト鼻粘膜をパラフィン包埋し, クリオスタットで5μm厚に切断し MAS コート付きスライドガラス (Matunami, Japan) 上に貼り付けた。

3) *in situ* ハイブリダイゼーション: スライドガラスをキシレンで10分間 (2回) と100%エタノールで5分間 (3回) 脱パラフィンし, 風乾した。0.2 M HCl で1分間処理後, PBS で

5分間洗浄したのち, 10 μg/ml proteinase K (Behringer)/PBT (0.1% Tween/PBS) で37℃ 30分間処理を行った。4% PF/PBS で20分間固定し, 2mg/ml Glycine/PBT に5分間浸透させた。0.125 M トリエタノールアミン/0.25% HCl 400 ml に浸し, 攪拌しながら無水酢酸 1 ml を5分間かけて滴下し, さらに15分間攪拌しアセチル化した。50%ホルムアミド (FA)/5 × SSC を加え55℃ 40分間インキュベートしプレハイブリ

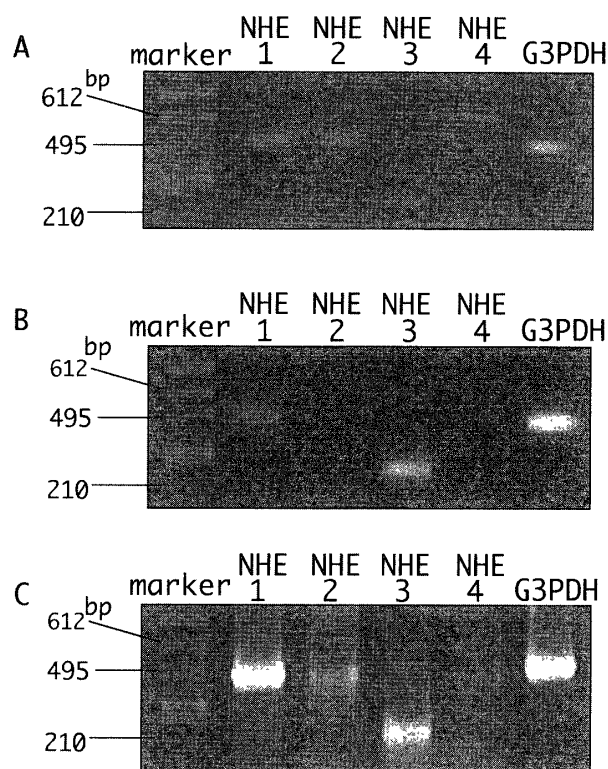


Fig. 1 RT-PCR products of NHEs from guinea pig ileum and nasal mucosa on the electrophoresed gel stained with ethidium bromide.

A: RT-PCR products of NHEs from guinea pig ileum 30-cycle PCR with external sense primers and antisense primers. With primers specific for NHE1, 2, 3, and 4, single band of 519 bp (lane 1, 2), 260 bp (lane 3), 646 bp (lane 4) were detected. marker, molecular weight marker ϕ X174-Hinc II.

B: RT-PCR products of NHEs from guinea pig nasal mucosa 30-cycle PCR with external sense primers and antisense primers. NHE1 and 3 single band were detected, where no band was observed using primers specific for NHE 2 and 4.

C: Nested PCR products from guinea pig nasal mucosa using internal sense primers and antisense primers. With primers specific for NHE1, 2, 3, and 4, single band of 460-470 bp (lane 1, 2, 4) or 256 bp (lane 3) were detected. marker, molecular weight marker ϕ X174-Hinc II.

ダイゼーションした。ハイブリダイゼーションは gpNHE1, 2, 3, 4, humNHE3 および センシ DIG 標識 RNA プローブ (1000 ng/ml) にハイブリダイゼーションバッファー (50% FA, 5 × SSC, 50 μg/ml, 0.1% SDS, 5 × デンハルト液) を加え 55℃ 20 時間行った。55℃ の 50% FA/ 2 × SSC で 30 分間, 2 × SSC で 10 分間, 0.2 × SSC で 20 分間 (2 回) 洗浄し, TBST (100 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) を 5 分間浸透させた。抗体反応は DIG Nucleic Acid Detection Kit (Behringer) を使用し, 1.5% ブロッキングバッファー (1.5% ブロッキング/TBST) を 1 時間, 1:500 アルカリホスファターゼ抗 DIG 抗体/ブロッキングバッファーを 4℃ 2 時間反応させた。TBST で 5 分間 (3 回) 洗浄した後, NTMT (0.1 M NaCl, Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 0.1% Tween) 3 分間, ついで 1:50 NBT/BCIP, 0.1 M levamisole/NTMT にて処理し, PBT で反応停止後顕微鏡で観察した。

結 果

1. モルモット鼻粘膜の RT-PCR

ポジティブコントロールは NHE1~4 のすべてが発現することが知られている小腸から抽出した mRNA の first strand cDNA を作製し PCR 増幅した。PCR 増幅の一次 PCR 反応産物の電気泳動は, NHE1~4 の目的の長さのバンドを認めた (Fig. 1-A)。ゲノム DNA の混入のないことは, G3 PDH で確認した。同様にモルモット鼻粘膜から得た first strand cDNA の一次 PCR 産物を電気泳動も, NHE1, 3 の目的の長さのバンドを認めた。しかし, NHE2, 4 のバンドは認められなかった (Fig. 1-B)。二次 PCR 反応では NHE1, 3 は強く NHE2, 4 は弱く現れるが,

目的の長さのバンドが存在し, 発現量に差があると考えられた (Fig. 1-C)。この PCR 産物の塩基配列は, NHE1, 2, 3, 4 と一致した。

2. モルモット NHE の塩基配列の確認

in situ ハイブリダイゼーションに用いるプローブを作製するためモルモット鼻粘膜 cDNA をプライマー S-1, AS-1, (Table 2) を用いて一次 PCR をし, さらにプライマー S-2, AS-2, (Table 2) を用いて二次 PCR を行った。二次 PCR 産物を pZErO™-2 にクローニングした。プラスミド gpNHE1, 2, 3, 4 を DNA シークエンサーで調べ, ラットの NHE1, 2, 3, 4 と一致した (Fig. 2)。モルモットの NHE1, 2, 3, 4 の配列はほとんどが知られておらず, ラット NHE と比較した塩基配列では NHE1 は 92.0%, NHE2 は 86.0%, NHE3 は 88.5%, NHE4 は 85.4% の相同性があり, アミノ酸配列では NHE1 は 97.2%, NHE2 は 97.2%, NHE3 は 96.3%, NHE4 は 94.5% の相同性があった。

NHE1	5	5a	
gpn:	GYFLPLRQFT ENLGTLLIFA VVGTLLWNAFF LGGLMYAVCL VGGEQINNIG LLQNLIFGSL ISAVDPVAVL AVFEEIHINE		257
rat:	*****	*****	
S-2	5b	6	
	LLHLVFGES LLNDAVTIVL YHLEEFESY EYGVGVDFL GFLSFFVAL GGVFVGWVG IIAFTSRFT AHIRVIEPLF		337
	*****	*****	
	7	8	
	VFLYSYMYL SAELFHLSGI MALIASGVVM RPYVEANISH KSHTTIKYFL KMWSS		442
	*****	*****	
NHE2	5	5a	
gpn:	GYFMPTRPFF ENIGTIFWYA VVGTLLWSIG IGVSLFGICQ IEAFGLRDT LLQNLIFGSL ISAVDPVAVL AVFENIHVNE		234
rat:	*****	*****	
S-2	5b	6	
	QLYILVFGES LLNDAVTIVL YNLKFSFCQM KTIEIVDVFA GIANFFVVG IIAFTTRFT HNIRVIEPLF		314
	*****	*****	
	7	8	
	VFLYSYLSYI TAEMFHLSGI MAITACAMT NKVVEENVSQ KSYTTIKYFM KMLSS		369
	*****	*****	
NHE3	5	5a	
gpn:	GYFMPNRLFF GNLGTLLIYA VIGTVWNAAT TGLSLYGVFC SGLMGDLKTG LLDFLLFGSL ISAVDPVAVL AVFEEHVNE		204
rat:	*****	*****	
S-2	5b	6	
	VLFIIVFGES LLNDAVTIVL YNVFESFVMI GGDKVTGVDC VKGIVSFFV SLGGTLGVV FAFLLSVTR FTKHVRIIEP		284
	*****	*****	
	7	8	
	GVFVVISYLS YLTSEMLSLS AILAITFCGI CCQKYVKANI SEQSAITVRY TMKMLAS		341
	*****	*****	
NHE4	5	5a	
gpn:	GYFMPTRPFF ENLGSILWNA GLGALINAFG IGLSLYLVQC VQAFGLDLH LLQNLIFGSL ISAVDPVAVL AVFEEARVNE		222
rat:	*****	*****	
S-2	5b	6	
	QLYIMIFGEA LLNDGISVVL YNIIAFTKM HKFEDIEPVD ILAGCARFIV VGGGGVFFGI IFGFISAFIT RFTQNISAE		302
	*****	*****	
	7	8	
	PLIVFMFSYL SYLAAETLYL SGILAITSCA VTMKKYVEEN VSQTSYTIK YFMKMLAS		360
	*****	*****	

Fig. 2. Comparisons of deduced amino acid sequence of cloned NHE fragments from guinea pig nasal mucosa with rat.^{9), 10)} Amino acid numbers of rat sequences are shown on the right. Asterisks denote amino acid identity. The primers used in nested PCR recognize the nucleotides encoding amino acids which are underlined. Membrane-spanning domains are overlined. gpn, guinea pig nasal mucosa.

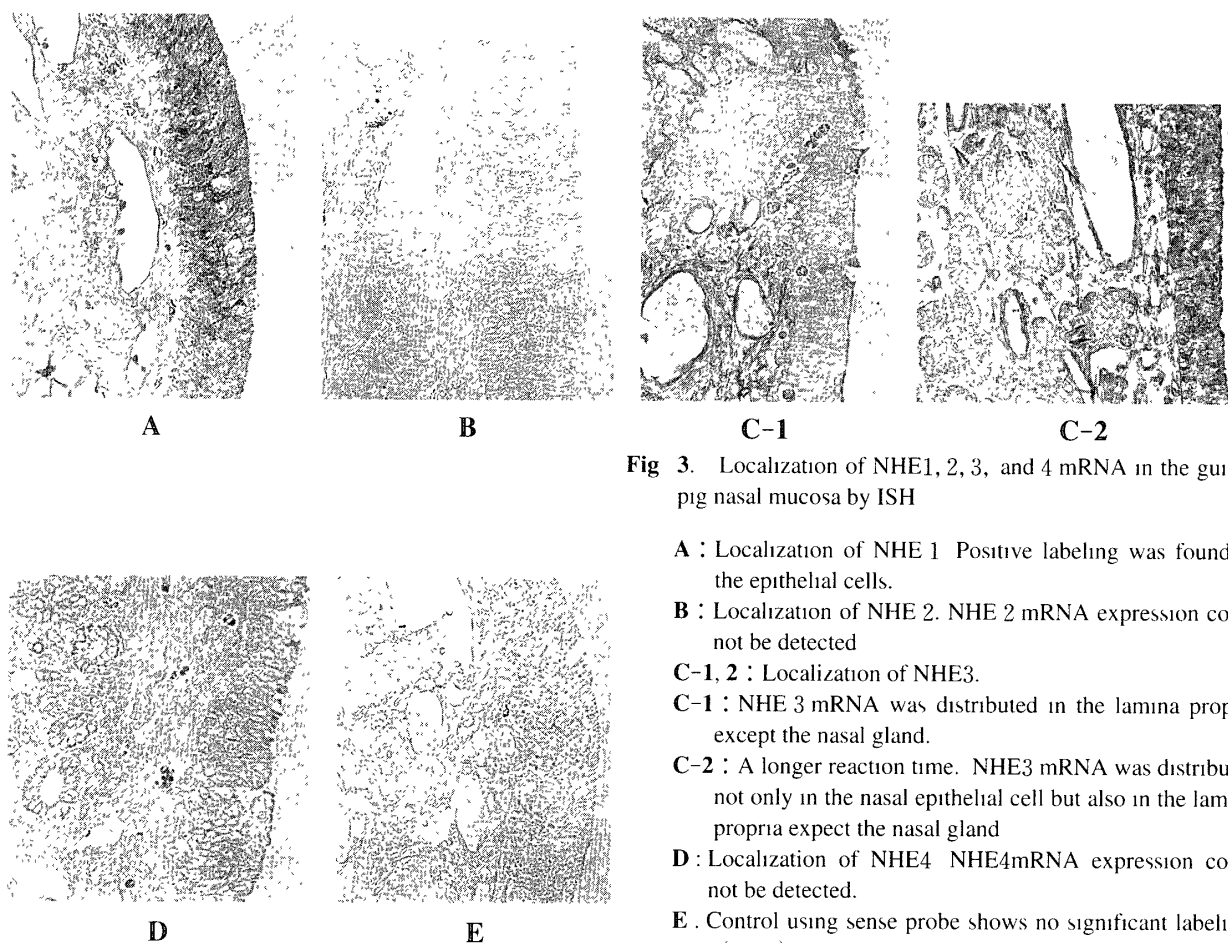


Fig 3. Localization of NHE1, 2, 3, and 4 mRNA in the guinea pig nasal mucosa by ISH

- A :** Localization of NHE 1 Positive labeling was found in the epithelial cells.
B : Localization of NHE 2. NHE 2 mRNA expression could not be detected
C-1, 2 : Localization of NHE3.
C-1 : NHE 3 mRNA was distributed in the lamina propria except the nasal gland.
C-2 : A longer reaction time. NHE3 mRNA was distributed not only in the nasal epithelial cell but also in the lamina propria except the nasal gland
D : Localization of NHE4 NHE4mRNA expression could not be detected.
E : Control using sense probe shows no significant labeling. ($\times 40$)

3. モルモット鼻粘膜の *in situ* ハイブリダイゼーション

モルモット鼻粘膜における NHE1~4 の mRNA の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法で調べた。鼻粘膜上皮に NHE1 の発現を認めた (**Fig. 3-A**)。NHE3 は、粘膜固有層で発現するが腺細胞では認められなかった (**Fig. 3-C-1**)。さらに長時間の発色反応では鼻粘膜上皮でも発現を認めたが、腺細胞では検出されなかった (**Fig. 3-C-2**)。ネガティブコントロールと比較して明らかに染まっているのがわかる (**Fig. 3-E**)。NHE2, 4 の発現は認められなかった (**Fig. 3-B, D**)。ポジティブコントロールとして、存在することが知られている回腸¹⁶⁾を用いて同じプローブで *in situ* ハイブリダイゼーションを行うと、すでに報告されているように回腸上皮に NHE1~4 が発現していた (**Fig. 4**)。

4. ヒト鼻粘膜の *in situ* ハイブリダイゼーション

モルモットで発現を認めた NHE3 についてヒト鼻粘膜でも確認を試みた。モルモットの結果と同様、鼻粘膜上皮細胞、基底膜や粘膜固有層でも発現を認めた。しかし、腺細胞での発現はなかった (**Fig. 5-A, C**)。ネガティブコントロールと比較して明らかに染まっている (**Fig. 5-B**)。

考 察

生理学的手法で気道のうち鼻茸、鼻粘膜上皮細胞^{35), 36)} および II 型肺胞上皮細胞の培養細胞の基底膜側にアミロライド感受性の NHE が存在し、またヒトの気管、気管支に NHE1 が発現していることは RT-PCR 法で確認されている³⁷⁾。Dudeja PK ら³⁷⁾ は representative RNase protection blot 法で呼吸細気管支、細気管支、気管支、気管での NHE1 の RNA の発現量を比較し、上気道側になるにしたがい発現量が増加すると

している。今回、一次 PCR で鼻粘膜に NHE1, 3 の発現を認めた。さらに、鼻粘膜での局在を調べるため *in situ* ハイブリダイゼーションを行った。モルモット鼻粘膜のうち上皮細胞にハウスキーピングで主に pH 調節に関与している NHE1 の mRNA の発現を認めた。この結果は、これまでの報告に矛盾しない。NHE1 はハウスキーピングでありすべての細胞に存在するため、気道上皮細胞での発現も当然のことである。しかし、*in situ* ハイブリダイゼーションで、鼻粘膜上皮細胞に特に多く存在することが明らかとなり、NHE1 は鼻粘膜上皮細胞では単なるハウスキーピングとしてだけでなく、上皮におけるイオン輸送に大きく関与していると思われる。

また、一次 PCR で鼻粘膜に発現を認めた NHE3 は、*in situ* ハイブリダイゼーション法で粘膜固有層で発現を認めたが腺細胞では認めら

れなかった。長時間の発色反応では、鼻粘膜上皮にも発現を認めたが、腺細胞では検出されなかった。NHE3 は鼻粘膜上皮細胞に発現していることが明らかとなったが、NHE1 と比較し少ないと思われる。ヒト鼻粘膜では粘膜固有層に強い発現を認めるものの、上皮細胞では弱い発現が認められるのみであり、モルモットと同様の結果を得た。NHE3 は主に Na^+ イオンの吸収作用があり、NHE3 は鼻粘膜上皮細胞の水分、 Na^+ イオン調節に関与していると考えられる。

鼻粘膜における NHE2, 4 の発現は、二次 PCR でのみわずかに検出された。*in situ* ハイブリダイゼーション法でも発現は認められず、RNA の発現は極めて少ないことがわかった。

膜輸送蛋白は、興奮性膜細胞（神経、筋）の興奮性、および非興奮性膜細胞（上皮、腺）の輸送現象（吸収、分泌）を行う細胞膜でのイオン通路である。気道上皮でも膜輸送蛋白の役割が報告されている³⁹⁾。気道粘膜の主要な機能は、1, 粘液線毛輸送機能、2, 水・電解質の分泌・吸収機能、3, 局所免疫機能などがあげられる。粘液線毛輸送機能が円滑に行われるには、ASL の組成が重要である⁴⁰⁾。線毛細胞の活性を表す線毛打頻度は、温度、湿度、ASL の浸

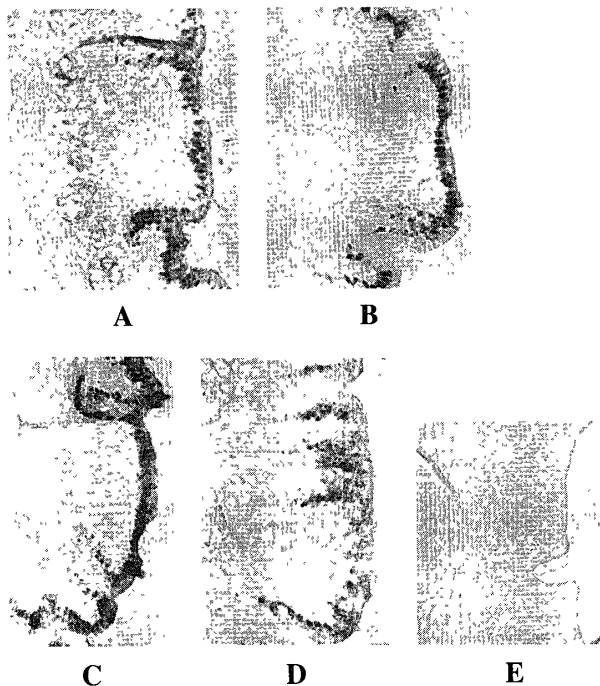


Fig. 4 Localization of NHE1, 2, 3, and 4 mRNA in the guinea pig ileum by *in situ* hybridization with digoxigenin-labeled cRNA probe.

A : NHE1.

B : NHE2.

C : NHE3.

D : NHE4. Positive labeling was found in the epithelial cells.

E : Control using sense probe shows no significant labeling. ($\times 40$)

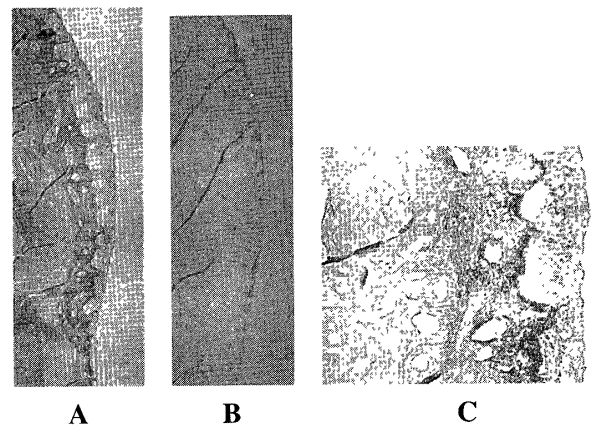


Fig. 5. Localization of NHE3 mRNA in the human (40 yr old male) concha nasalis inferior undergoing conchotomy for nasal obstruction by ISH with digoxigenin labeled cRNA probe.

A, C : NHE 3 mRNA was distributed in the lamina propria, except the nasal gland, and in the nasal epithelial cell. ($\times 10$), ($\times 40$)

B : Control using sense probe shows no significant labeling.

透圧, pH などの因子によって影響を受ける³⁴⁾. 気道上皮細胞の膜輸送蛋白の水・電解質の分泌・吸収機能が, ASL の量, イオン構成, 浸透圧, pH 調節に重要な役割をもっている^{41), 42)}.

ASL の pH はヒトの気管で平均 pH 6.71-6.97⁴³⁾, ウサギの気管で pH 6.73, ラットの気管で pH 7.42-7.57⁴⁴⁾, マウスの気管で pH 6.95⁴³⁾と報告されている. 酸性に傾くと線毛活性は低下し, pH 6.4で停止する³³⁾.

Nielson⁴⁵⁾は麻酔下のウサギの肺胞中の粘液の pH は 6.92 ± 0.04 で血液成分の変化にもかかわらず恒常性があると報告している. 同様に Robinson ら⁴⁶⁾, Kyle ら⁴⁷⁾は, 摘出したフェレットの気管を用いて ASL の pH は粘膜下の pH と比較して酸性 (pH 6.85-7.12) であり, 気管内の CO_2 濃度, 粘膜下の溶液の pH を変化させても維持されると報告している. 逆に Jayaraman ら⁴⁸⁾は, 牛の気道上皮の培養細胞を用いて, 細胞の基底膜側の溶液の pH を変化させると ASL の pH はそれに比例して変化すると報告している. ASL の pH の変化は溶液の pH の変化と比較すると小さく, ASL の pH が気道上皮細胞の影響を受けていることが示唆された.

気道上皮細胞自体の pH への NHE の関係として, 生理学的手法で溶液中に HCO_3^- が存在しない状態に保たれたとき, ヒトの鼻粘膜上皮細胞および鼻茸の培養細胞で上皮細胞自体の pH のホメオスタシスの維持にアミロライド感受性の NHE の関与が報告されている^{35), 36)}. ASL の pH への NHE の関係として, Jayaraman ら⁴⁸⁾は, 同様に HCO_3^- が存在しない状態でウシの気道上皮の培養細胞の ASL の pH にアミロライド感受性のある NHE が関与してるとしている. つまり, 他の膜蛋白同様気道上皮細胞での NHE は, 上皮細胞自体の pH のホメオスタシスの維持だけでなく ASL の pH にも関与していると考えられる.

線毛打頻度への影響は, ASL と上皮間との浸透圧によっても規定され, 285~427.5 mOsm/Kg で安定している³³⁾. 気道中枢部の ASL の Na^+ イオンの細胞内への吸収は, 管腔側のアミ

ロライド感受性 Na^+ チャンネルにより, 次いで基底膜側の Na^+/K^+ ATPase によって基底膜側に吸収される. 同時に基底膜側 K^+ イオンの細胞内流入が起こる. これにより生じる電気化学的勾配の変化は, 基底膜側に局在する Na-K-Cl 共輸送体からの Na^+ イオン, K^+ イオン, Cl^- イオンの細胞内流入を高める. さらに細胞内に蓄積された Na^+ イオンと K^+ イオンはそれぞれ Na^+/K^+ ATPase と K^+ チャンネルにより再び基底膜側に排出される. 一方, Cl^- イオンは管腔側の Cl^- チャンネルを介して気腔に分泌され, これに伴って水分が分泌される^{41), 42), 49)}. また, 池田ら⁵⁰⁾は上皮細胞では無刺激状態で, 水分の吸収を伴う Na^+ イオンと Cl^- イオンの積極的な吸収により, 等張性吸収が行われ, 鼻粘膜上皮細胞の管腔側に存在する Na^+ チャンネルと cystic fibrosis transmembrane conductance regular (CFTR) Cl^- チャンネルが鼻粘膜上の粘液の吸収に関与していると報告している. これらイオン輸送に伴う水の移動により浸透圧が調節されている. 鼻粘膜上皮細胞の NHE1 および 3 は, 上皮細胞自体に作用するだけでなく, ASL の pH 調節に関与し, さらに Na^+ イオン吸収に伴う ASL の浸透圧調節も行っているかもしれない.

ASL の異常が生体に及ぼす影響として嚢胞性線維症, 喘息, 気管支収縮, 咳反射, 気道感染などがある^{24)~32)}. pH の影響としては, ASL の pH の低下が喘息での神経反射を刺激するとの発表がある³¹⁾. 粘液の pH の低下はムチンの増加により粘性を増し粘膜を保護するが, Palmer ら⁵¹⁾は気道粘膜の pH の上昇は気管細胞の細菌感染を起こすとし, ASL の pH が上気道感染に対しても影響している. また, Robinson ら⁴⁶⁾はヒスタミン負荷で ASL の量の増加, pH の低下, H^+ イオンと Ca^{2+} イオンの増加を, Chakravarty ら⁵²⁾は抗原暴露によるヒスタミン分泌は主に細胞外のカルシウムに依存し, pH が高値のとき分泌が抑制されたことから, ASL の pH とヒスタミンの関与を報告している. また, $\text{IFN-}\gamma$ による腸間粘膜の長期間刺激で NHE2, 3 の mRNA, 蛋白の発現が低下し,

NHE とサイトカインの関与も報告されている⁵³⁾。気道アレルギーにも ASL の pH および NHE が関与していることが示唆される。

NHE は直接的に Na^+ イオン濃度、水分、pH を調節するだけでなく、間接的に $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送蛋白、pH 依存性の酵素やチャンネルの開閉にも影響を与える。これによって間接的に Ca^{2+} イオン濃度、ASL の pH、浸透圧、サイトカインに影響することでアレルギー性鼻炎に関与しているかもしれない。

結 語

今回、モルモットおよびヒト鼻粘膜における NHE1, 2, 3, 4 の局在について検討した。1) モルモット鼻粘膜から RT-PCR 法で NHE1, 3 を検出した。二次 PCR では NHE1~4 すべてを認めたが、NHE2, 4 の発現量は極めて少ないことがわかった。2) モルモット鼻粘膜を用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法で、ハウスキーピングである NHE1 は鼻粘膜上皮細胞でのみ発現を認め、NHE3 は粘膜固有層、および発現量

は少ないが上皮細胞でも認め、鼻粘膜上皮細胞だけでなく ASL の pH 調節、 Na^+ イオン、水分、浸透圧調節に関与していると考えられた。NHE2, 4 の発現は認められなかった。3) ヒト鼻粘膜の NHE3 の発現について *in situ* ハイブリダイゼーションを行い、モルモット同様に鼻粘膜上皮細胞、粘膜固有層で発現し、腺細胞では発現していなかった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導をいただきました川崎医科大学耳鼻咽喉科学教室原田 保教授に深甚なる謝意を表します。また RT-PCR 法、*in situ* ハイブリダイゼーション法など分子生物学的手法の御指導いただきました香川医科大学耳鼻咽喉科学教室森望教授、古田浩助教授、同分子生物学教室佐藤忠文助教授、川崎医科大学分子生物学教室濃野 勉助教授、西松伸一郎講師、同神経病理学教室伏見滋子先生に感謝申し上げます。本研究の一部は、大学院重点特別経費（平成12年度）および川崎医科大学プロジェクト研究費（13-206）の援助によって行われた。なお、本論文の要旨は第24回日本分子生物学会年会（2001年12月9日、横浜）にて発表した。

文 献

- 1) Aronson PS : Kinetic properties of the plasma membrane Na^+/H^+ exchanger. *Annu Rev Physiol* 47 : 545-560, 1985
- 2) Clark JD, Limbird LE : Na^+/H^+ exchanger subtypes : a predictive review. *Am J Physiol* 261 (6 Pt 1) : C945-953, 1991
- 3) Wakabayashi S, Sardet C, Fafournoux P, Counillon L, Meloche S, Pages G, Pouyssegur J : Structure function of the growth factor-activatable Na^+/H^+ exchanger (NHE1). *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 119 : 157-186, 1992
- 4) Knickelbein R, Aronson PS, Atherton W, Dobbins JW : Sodium and chloride transport across rabbit ileal brush border. Evidence for Na-H exchange. *Am J Physiol* 245 : G504-510, 1983
- 5) Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J : Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol Rev* 77 : 51-74, 1997
- 6) Wakabayashi S, Bertrand B, Shigekawa M, Fafournoux P, Pouyssegur J : Growth factor activation and "H(+)-sensing" of the Na^+/H^+ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. *J Biol Chem* 269 : 5583-5588, 1994
- 7) Orlowski J, Grinstein S : Na^+/H^+ exchanger of mammalian cells. *J Biol Chem* 272 : 22373-22376, 1997
- 8) Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J : Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na^+/H^+ antiporter. *Cell* 56 : 271-280, 1989

- 9) Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE : Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na/H exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J Biol Chem* 267 : 9331 – 9339, 1992
- 10) Wang Z, Orlowski J, Shull GE : Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger *J Biol Chem* 268 : 11925 – 11928, 1993
- 11) Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orlowski J, Otterud BE, Leppert M : Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na⁺/H⁺ exchanger(NHE5/SLC9A5) to chromosome 16 q 22.1 *Genomics* 25 : 615 – 622, 1995
- 12) Tse CM, Brant SR, Walker MS, Pouyssegur J, Donowitz M : Cloning and sequencing of a rabbit cDNA encoding an intestinal and kidney-specific Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-3) *J Biol Chem* 267 : 9340 – 9346, 1992
- 13) Numata M, Petrecca K, Lake N, Orlowski J : Identification of a mitochondrial Na⁺/H⁺ exchanger *J Biol Chem* 273 : 6951 – 6959, 1998
- 14) Numata M, Orlowski J : Molecular cloning and characterization of a novel (Na⁺, K⁺) /H⁺ exchanger localized to the trans-Golgi network *J Biol Chem* 276 : 17387 – 17394, 2001
- 15) Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, Orlowski J, Shrier A : Subcellular localization of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE1 in rat myocardium *Am J Physiol* 276 : H 709 – 717, 1999
- 16) Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y, Niu P, Musch MW, Rao MC, Chang EB : Na⁺/H⁺ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine Expression and localization *J Clin Invest* 93 : 106 – 113, 1994
- 17) Vilella S, Guerra L, Helmle-Kolb C, Murer H : Characterization of basolateral Na/H exchange (Na/H-1) in MDCK cells. *Pflugers Arch* 420 : 275 – 280, 1992
- 18) Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouyssegur J, Donowitz M : Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na⁺/H⁺ exchanger isoform (NHE-2) *J Biol Chem* 268 : 11917 – 11924, 1993
- 19) Brant SR, Yun CH, Donowitz M, Tse CM : Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na⁺/N⁺ exchanger isoform, NHE3 *Am J Physiol* 269 : C198 – 206, 1995
- 20) Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS : NHE3 : a Na⁺/H⁺ exchanger isoform of renal brush border *Am J Physiol* 265 : F 736 – 742, 1993
- 21) Szabo EZ, Numata M, Shull GE, Orlowski J : Kinetic and pharmacological properties of human brain Na(+) /H(+) exchanger isoform 5 stably expressed in Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* 275 : 6302 – 6307, 2000
- 22) Benos DJ : Amiloride : a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 242 : C131 – 145, 1982
- 23) Mahnensmith RL, Aronson PS : The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes *Circ Res* 56 : 773 – 788, 1985
- 24) Boucher RC : Molecular insights into the physiology of the 'thin film' of airway surface liquid. *J Physiol* 516 : 631 – 638, 1999
- 25) Higenbottam T : The ionic composition of airway surface liquid and coughing *Bull Eur Physiopathol Respir* 10 : 25 – 27, 1987
- 26) Kyle H, Ward JP, Widdicombe JG : Control of pH of airway surface liquid of the ferret trachea in vitro *J Appl Physiol* 68 : 135 – 140, 1990
- 27) Pilewski JM, Frizzell RA : Role of CFTR in airway disease *Physiol Rev* 79(1 Suppl) : S215 – 255, 1999
- 28) Kerem E, Bistrizer T, Hanukoglu A, Hofmann T, Zhou Z, Bennett W, MacLaughlin E, Barker P, Nash M, Quittell L, Boucher R, Knowles MR : Pulmonary epithelial sodium-channel dysfunction and excess airway liquid in pseudohypoaldosteronism *N Engl J Med* 341 : 156 – 162, 1999
- 29) Matsui H, Grubb BR, Tarran R, Randell SH, Gatzky JT, Davis CW, Boucher RC : Evidence for periciliary liquid layer depletion, not abnormal ion composition, in the pathogenesis of cystic fibrosis airways disease. *Cell* 95 : 1005 – 1015,

1998

- 30) Smith JJ, Travis SM, Greenberg EP, Welsh MJ : Cystic fibrosis airway epithelia fail to kill bacteria because of abnormal airway surface fluid. *Cell* 85 : 229–236, 1996
- 31) Wong CH, Matai R, Morice AH : Cough induced by low pH. *Respir Med* 93 : 58–61, 1999
- 32) Higenbottam T : Cough induced by changes of ionic composition of airway surface liquid. *Bull Eur Physiopathol Respir* 20 : 553–562, 1984
- 33) 夜陣紘治：慢性副鼻腔炎の病態と治療－粘膜・骨病変の視点から－. 広島大学耳鼻咽喉科学教室. 2001, pp 26–27
- 34) Nord EP, SES Brown, ED Crandall : Characterization of Na^+/H^+ antiport in type II alveolar epithelial cell. *Am J Physiol* 252 : C490–498, 1987
- 35) Paradiso AM : Identification of Na^+/H^+ Exchanger in human normal and cystic fibrotic ciliated airway epithelium. *Am J Physiol* 262 : L757–764, 1992
- 36) Paradiso AM : ATP-activated basolateral Na^+/H^+ exchange in human normal and cystic fibrosis airway epithelium. *Am J Physiol* 273 : L148–158, 1997
- 37) Dudeja PK, Hafez N, Tyagi S, Gailey CA, Toofanfar M, Alrefai WA, Nazir TM, Ramaswamy K, Al-Bazzaz FJ : Expression of the Na^+/H^+ and $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchanger isoforms in proximal and distal human airways. *Am J Physiol* 276 : L971–978, 1999
- 38) Goto S, Oshima T, Ikeda K, Takasaka T : Expression and localization of the Na^+/H^+ exchanger in the guinea pig cochlea. *Hear Res* 128 : 89–96, 1999
- 39) Steel DM, Graham A, Geddes DM, Alton EW : Characterization and comparison of ion transport across sheep and human airway epithelium. *Epithelial Cell Biol* 3 : 24–31, 1994
- 40) 奥田 稔：SEM による鼻粘膜の観察. 耳鼻臨床 63 : 763–771, 1970
- 41) 玉置 淳：気道アレルギー'97.「喀痰分泌機構」(牧野莊平, 石川 哮監修)第1版. 東京, メディカルレビュー社. 1997, pp 31
- 42) Welsh MJ : Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol Rev* 67 : 1143–1184, 1987
- 43) Jayaraman S, Song Y, Vetrivel L, Shankar L, Verkman AS : Noninvasive in vivo fluorescence measurement of airway-surface liquid depth, salt concentration, and pH. *J Clin Invest* 107 : 317–324, 2001
- 44) Gatto LA : pH of mucus in rat trachea. *J Appl Physiol* 50 : 1224–1226, 1981
- 45) Nielson DW : Electrolyte composition of pulmonary alveolar subphase in anesthetized rabbits. *J Appl Physiol* 60 : 972–979, 1986
- 46) Robinson NP, Kyle H, Webber SE, Widdicombe JG : Electrolyte and other chemical concentrations in tracheal airway surface liquid and mucus. *J Appl Physiol* 66 : 2129–2135, 1989
- 47) Kyle H, Ward JP, Widdicombe JG : Control of pH of airway surface liquid of the ferret trachea in vitro. *J Appl Physiol* 68 : 135–140, 1990
- 48) Jayaraman S, Song Y, Verkman AS : Airway surface liquid pH in well-differentiated airway epithelial cell cultures and mouse trachea. *Am J Physiol Cell Physiol* 281 : C1504–1511, 2001
- 49) 玉置 淳：気道分泌. アレルギー 40 : 1439–1446, 1991
- 50) 池田勝久：粘膜防御機能（局所的防御－3）. 新図説耳鼻咽喉科・頭頸部外科講座. 鼻・副鼻腔.（夜陣紘治編）第1版. 東京, メディカルレビュー社. 2000, pp 22–23
- 51) Palmer LB, Merrill WW, Niederman MS, Ferranti RD, Reynolds HY : Bacterial adherence to respiratory tract cells. Relationships between in vivo and in vitro pH and bacterial attachment. *Am Rev Respir Dis* 133 : 784–788, 1986
- 52) Chakravarty N, Yu WJ : Regulatory role of calcium on histamine secretion. *Agents Actions* 18 : 57–60, 1986
- 53) Rocha F, Musch MW, Lishansky L, Bookstein C, Sugi K, Xie Y, Chang EB : IFN- γ downregulates expression of Na^+/H^+ exchangers NHE2 and NHE3 in rat intestine and human Caco-2/bbe cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 280 : C1224–1232, 2001